

Résumé

Les isolats de *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. provenant de feuilles de cocotier présentent des différences morphologiques par rapport aux isolats obtenus à partir des noix de cocotier et d'autres plantes hôtes. Tous les isolats provenant de cocotiers comportent des spores de $20\text{ }\mu\text{m} \times 8\text{ }\mu\text{m}$ et produisent un mycélium blanc. Les isolats non pathogènes présentent des conidies de taille en général plus importante ($24\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$), un mycélium bien plus foncé et une bonne croissance sur un milieu à base d'avoine. Avec les malates deshydrogénases, deux types électrophorétiques sont obtenus, TE1 et TE2. TE1 regroupe les isolats pathogènes pour le cocotier, TE2 les non pathogènes. Ce travail contribue à confirmer l'appellation taxonomique nouvelle donnée aux isolats présentant un pouvoir pathogène à l'égard des feuilles du cocotier.

Abstract

Isolates of *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. recovered from coconut leaves were morphologically different from the isolates obtained from coconut fruits and from other host plants. All the isolates from coconuts had spores averaging $20\text{ }\mu\text{m} \times 8\text{ }\mu\text{m}$ in size and produced a white mycelium. The non-pathogenic isolates had generally larger conidia ($24\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$), a much darker mycelium and good growth on oat medium. Two electrophoretic types were obtained with malate dehydrogenases, ET1 and ET2. ET1 grouped the isolates pathogenic to coconut and ET2 the non-pathogenic isolates. This work contributes to confirming the new taxonomic denomination to isolates pathogenic to coconut leaves.

Resumen

Las cepas de *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. aisladas de hojas de cocotero presentan diferencias morfológicas con respecto a las cepas aisladas logradas de nueces de cocotero y otras plantas huéspedes. Todas las cepas de cocoteros tienen esporas de $20\text{ }\mu\text{m} \times 8\text{ }\mu\text{m}$ y producen un micelio blanco. Las cepas aisladas no patógenas presentan conidias de tamaño por lo general más importante ($24\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$), un micelio bastante más oscuro y un buen crecimiento en un medio a base de avena. Con las malatas deshidrogenasas, se consiguen dos tipos electroforéticos, TE1 y TE2. TE1 reúne las cepas aisladas patógenas para el cocotero, TE2 las no patógenas. Este trabajo contribuye a dar nueva denominación taxonómica a las cepas aisladas patológicas con respecto de hojas de cocotero.

La «queima das folhas» du cocotier

Warwick D.¹, Renard J.L.², Blaha G.²

¹ EMBRAPA, CP 44, Aracaju, SE 49001.970, Brésil

² CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Le cocotier (*Cocos nucifera* L.), culture villageoise dont l'exploitation est sans danger pour l'environnement, offre une gamme de possibilités en matière de nutrition, de revenus et d'emplois. Introduit au Brésil par les Portugais en 1553, le cocotier est largement cultivé aujourd'hui dans la zone côtière de la région du Nord-Ouest qui fournit 72 % de la production nationale. La cocoteraie couvre environ 180 000 ha mais le rendement moyen n'est que de 20 noix/arbre/an (Iboe, 1989). Cette mauvaise productivité des arbres est due à des variétés à faible rendement, à une pluviométrie irrégulière et aux attaques d'un nombre important d'insectes nuisibles et de maladies fongiques.

Le «leaf blight» (queima das folhas) responsable de pertes importantes dans diverses cocoteraies, représente la principale maladie du cocotier au Brésil (Warwick, 1989). Les symptômes comprennent un dépérissement rapide, un brunissement ou une coloration rouge des feuilles et, à terme, une réduction de la surface foliaire assimilatrice ainsi que la rupture prématurée des pédoncules à leur point d'insertion sur la tige, d'où un affaissement du régime, habituellement soutenu par la feuille, et une chute prématurée des noix (Warwick, Bezerra et Renard, 1991). Signalée pour la première fois dans l'Etat de Sergipe (Franco, 1975), la maladie s'est répandue rapidement. Les observations au champ ont montré la présence de la maladie dans les états de Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte et Pará (Renard, 1990). Plus récemment, sa présence a été signalée en Guyane (Renard, communication personnelle), ce qui montre que les champignons gagnent vers le nord-ouest de l'Amérique du Sud en direction d'autres pays producteurs de cocotiers.

La «queima das folhas» a longtemps été attribuée à un complexe de trois champignons : une forme conidienne, *Lasiodyplodia theobromae* (Pat.) Griffon et Maudl as-

sociée à deux champignons ascomycètes, *Phyllachora torrendiella* (Batista, 1948) et *Sphaerodothis acrocomiae* (Joly, 1916). Récemment, une nouvelle appellation a été proposée pour le stade parfait de l'agent causal du «leaf blight», *Botryosphaeria cocogena* Subileau (Subileau, 1993 ; Subileau et al., 1994). *Botryosphaeria* sp. se trouve souvent sur d'autres cultures pérennes (Cline et Milholland, 1992 ; Milholland, 1972 ; Schreiber, 1964). La rouille des tiges de myrtille, due à *B. dothidea*, est la première cause de mauvaises récoltes dans des plantations âgées d'un à deux ans en Caroline du Nord (Creswell et Milholland, 1987). Dans le cas du pêcher, le stress hydrique augmente la sévérité de la maladie (Pusey, 1989). La rouille des pousses de pistachier, due à *Botryosphaeria panicle*, est une maladie fréquente dans les vergers du nord-ouest de la Californie (Michailides et Morgan, 1992). La variation du pouvoir pathogène des isolats de *B. dothidea* a été signalée par d'autres chercheurs : Davis et al. (1987) ont mis en évidence une variabilité importante de la virulence de divers isolats responsables de la maladie du tronc de jeunes citronniers ; Creswell et Milholland (1987) ont classé les isolats provenant de myrtille en deux groupes selon leur virulence ; une variation du pouvoir pathogène a également été signalée sur d'autres plantes hôtes (Pusey et al., 1986; Sutton et Boyne, 1983).

Ram (1993) a observé que les isolats de *Botryosphaeria* provenant d'autres plantes s'avèrent non pathogènes chez le cocotier sans pouvoir mettre en évidence des différences au niveau de la taille des conidies.

Ce travail a eu pour but d'évaluer la variabilité des caractéristiques morphologiques et culturelles ainsi que le pouvoir pathogène sur cocotier d'isolats de *Botryosphaeria* provenant des divers organes du cocotier (noix, feuilles, rachis) ou d'autres plantes hôtes. La variabilité au niveau des profils isoenzymatiques a été également recherchée compte

tenu de l'utilisation des analyses des isozymes pour la caractérisation et l'identification d'isolats appartenant à une même espèce (Oudemans et Coffey, 1991 ; Nygaard *et al.*, 1989), ou à des espèces d'un genre donné (Powers *et al.*, 1989 ; Bosland et Williams, 1987 ; Wong et Willets, 1975). Par ailleurs, avec cette technique, des différences intraspécifiques ont été mises en évidence, des formes spéciales ont été identifiées (Burdon et Marshall, 1981) et des différences entre races physiologiques ont été étudiées (Helmann et Christ, 1991 ; Damaj *et al.*, 1993).

Matériel et méthodes

Cinquante-quatre isolats provenant de plantes hôtes et de localités diverses ont été étudiés (tableau 1). Les isolats ont été obtenus, soit à partir de cultures en collections, soit à partir de prélèvements sur les organes de cocotiers infectés, de différentes régions du Brésil et de la Guyane française.

Caractéristiques morphologiques

Les isolats sont mis en culture sur un milieu à base d'avoine pendant sept jours à 24 °C. La croissance radiale, la couleur du mycélium et la production de spores sont notées. Le diamètre des conidies est mesuré sur 20 spores par isolat.

Pouvoir pathogène sur cocotier

Le pouvoir pathogène et la virulence de chaque isolat sont étudiés en serre sur de jeunes hybrides de cocotier PB 121, Nain Jaune de Malaisie x Grand Ouest Africain (photo 1). L'inoculum est utilisé sous forme

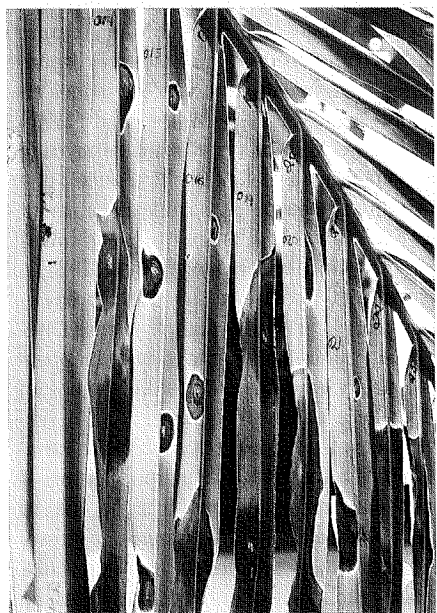


Photo G. Blaha

Photo 1 : Palme malade après inoculation
Diseased palm after inoculation

Tableau 1. Souches de *Botryosphaeria* utilisées dans les essais
Botryosphaeria strains used in the trials

Souches/strains	Origines/origin
AR 01 (*)	papaye/papaya, Se (**)
AR 02	rachis de feuille/leaf rachis, St. Lucia, Se
AR 03	rachis de feuille/leaf rachis, St. Lucia, Se
AR 04	rachis de feuille/leaf rachis, N. S. Socorro, Se
AR 05	feuille de cocotier/coconut leaf, Se
AR 06	feuille de cocotier/coconut leaf, Se
AR 07	noix, cocotier/coconut, fruit, St. Lucia
AR 08	noix, cocotier/coconut, fruit, Para
AR 09	noix, cocotier/coconut, fruit, N.S. Socorro, Se
AR 10	noix, cocotier/coconut, fruit, St. Lucia, Se
AR 11	noix, cocotier/coconut, fruit, S. Cristovão, Se
AR 12	noix, cocotier/coconut, fruit, S. Cristovão, Se
AR 13	<i>Bactris</i> , Se
AR 14	palmier royal/royal palm, Se. Roystonea sp.
AR 15	uricuri, palmier natif/Uricuri, native palm, Se
AR 16	piacava, palmier natif/piassava, native palm, Se
AR 17	rachis, cocotier/coconut, rachis, Se
AR 18	rachis, cocotier/coconut, rachis, Bahia
AR 19	rachis, cocotier/coconut, rachis, Itaporanga, Se
AR 20	rachis, cocotier/coconut, rachis, Jandaira, Bahia
AR 21	noix, cocotier/coconut, fruit, Pernambuco
AR 22	rachis, cocotier/coconut, rachis, Ceara
AR 23	cocotier/coconut, Maceio, Alagoas
AR 24	<i>citrus</i> , Se
AR 25	papaye/papaya, S. Paulo
AR 26	maracuja/passion fruit, Se
AR 27	mangue/mango, Pernambuco
AR 28	maracuja/passion fruit, Pernambuco
AR 29	papaye/papaya, Pernambuco
AR 30	noix, cocotier/coconut fruit, Pernambuco
AR 31	rachis de feuille/leaf rachis, Betume, Se
AR 32	conidies (lésions foliaires) Guyane française/conidia (leaf lesions) French Guiana
AR 33	périthèce (lésions foliaires) Guyane française/perithecia (leaf lesions) French Guiana
AR 34	<i>Botryosphaeria rhodia</i>
AR 35	<i>Botryosphaeria palmicola</i>
AR 36	rachis de feuille/leaf rachis, Betume, Se
AR 37	conidies (lésions foliaires)/conidia (leaf lesions) Pa (***)
AR 38	D1 (****)
AR 39	D2
AR 40	D3
AR 41	D4
AR 42	D5
AR 43	D6
AR 44	D7
AR 45	D8
AR 46	<i>Botryosphaeria dothidea</i> de pommier/apple, USA
AR 47	<i>Botryosphaeria dothidea</i> de pommier/apple, USA
AR 48	conidies (lésions foliaires)/conidia (leaf lesions), Pa
AR 49	conidies (lésions foliaires)/conidia (leaf lesions), Pa
AR 50	conidies (lésions foliaires)/conidia (leaf lesions), Pa
AR 51	conidies (lésions foliaires)/conidia (leaf lesions), Pa
AR 52	rachis, cocotier/coconut rachis, Betume, Se
AR 53	noix, cocotier/coconut fruit, Pa
AR 54	conidies (lésions foliaires)/conidia (leaf lesions), S. Cristovão, SE

* AR - Aracaju

** Se - Etat de Sergipe, Brésil/Sergipe State, Brazil

*** Pa - Etat du Pará, Brésil/Para State, Brazil

**** Souches mono ascospores obtenues de C. Subileau/Ascospore strains obtained from C. Subileau.

de disques mycéliens de 5 mm de diamètre à partir de cultures sur milieu gélosé âgées de 7 jours. Dix disques mycéliens provenant de chaque isolat sont placés sur des blessures effectuées sur la face inférieure des folioles à l'aide d'un scalpel stérilisé ; les arbres témoins reçoivent des disques d'agar stérile. Les feuilles sont emballées dans des sacs en plastique afin d'éviter tout dessèchement. L'essai comporte trois répétitions. Les symptômes qui résultent des inoculations font l'objet d'observations et de

mesures hebdomadaires. L'apparition de stromas sur les lésions est également notée.

Analyse isoenzymatique par électrophorèse

Les isolats sont ensemencés sur milieu gélosé V8 (200 ml de jus V8, 2,5 g de CaCO₃, 15 g d'agar et 800 ml d'eau distillée), recouverts d'un disque de cellophane et mis à incuber à l'obscurité et à 23 °C pendant sept jours. Le mycélium est prélevé à l'aide d'une spatule et broyé aux ultrasons à 4 °C

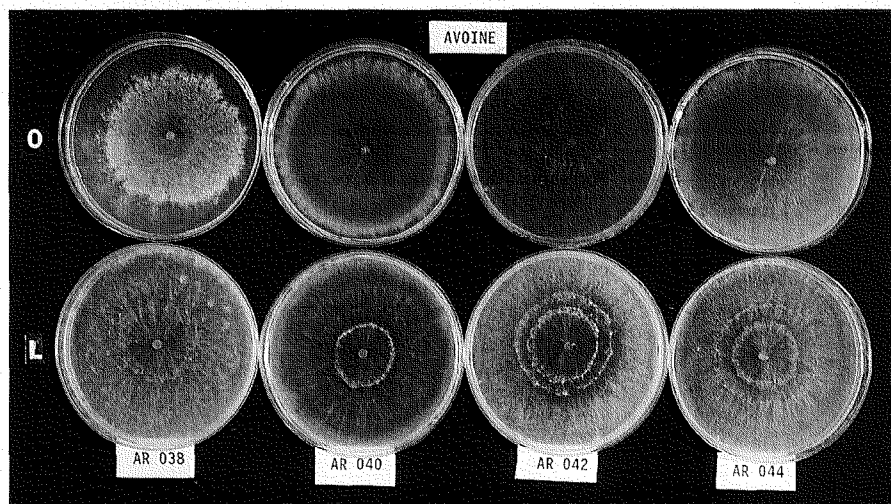


Photo 2 : Isolats monoascospores sur milieu avoine à 24 °C, à l'obscurité (O) et à la lumière intermittente (L)
Monoascospore isolates on an oat medium at 24 °C, in the dark (O) and in intermittent light (L)

Tableau 2. Enzymes étudiées pour les isolats de *Botryosphaeria*
Enzymes studied for the Botryosphaeria isolates

Enzymes/Enzymes	Tampons de révélation/Staining buffers
Oxydoréductases/Oxidoreductases	
Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase (G6PDH)	Tris-A
Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH)	Tris-A
Phosphogluconate Déshydrogénase (PGD)	Tris-A
Phosphogluconate Dehydrogenase (PGD)	Tris-A
Isocitrate Déshydrogénase (ICD)	Tris-A
Isocitrate Dehydrogenase (ICD)	Tris-A
Malate Déshydrogénase (MDH)	Tris-A
Malate Dehydrogenase (MDH)	Tris-A
Transférases hydrolases et lyases/Transferases hydrolases and lyases	
Phosphoglucomutase (PGM)	Tris-A
Phosphoglucomutase (PGM)	Tris-A
Estérases (CG)	Acétate-A
Esterases (CG)	Acetate-A
Autres/Others	
Phosphogluco isomérase (PGI)	Tris/HCl
Glucose-phosphate isomérase (GPI)	Tris/HCl
Malico-Enzyme (ME)	Tris-A
Malico-Enzyme (ME)	Tris-A
Glucosidases (GLU)	Phosphate
Glucosidases (GLU)	Phosphate
Hexokinase (HK)	Tris-A
Hexokinase (HK)	Tris-A

pendant 30 secondes dans un tampon citrate 0,1 M, pH 7,0 (1 g/ml). Les échantillons sont centrifugés à 10 000 g pendant 15 min à une température de 4 °C. Les surnageants sont stockés à -18 °C dans des cryotubes Eppendorf jusqu'à utilisation.

L'électrophorèse horizontale sur gel d'amidon (12 % p/v) est utilisée selon la méthode de Blaha (1990) ; les tampons et les

colorants sont ceux utilisés par Pasteur *et al.* (1987). Quinze microlitres de chaque échantillon sont déposés sur papier filtre Whatman No. 3 (5x10 mm) que l'on insère dans une fente coupée dans le gel. La migration est effectuée à 150 V/25 mA/gel dans une cuve horizontale HE 99 (Hoefer Scientific Instruments, USA) maintenue à 4 °C. Le front de migration est visualisé par

du bleu de bromophénol. Les tampons utilisés pour les migrations sont le Tris citrate, pH 8,0 (TC8), l'Histidine, pH 6,0 (H6) et le Borate de Lithium, pH 8,3 (LiOH). Les systèmes enzymatiques recherchés sont présentés dans le tableau 2.

Après migration, chaque gel est découpé en quatre tranches de 2 mm d'épaisseur, permettant ainsi la révélation de quatre systèmes enzymatiques différents pour chaque échantillon. Les tranches sont colorées pour chacune des dix enzymes selon des protocoles sélectifs (Pasteur *et al.*, 1987) puis fixées à l'acide acétique à 7 %, et séchées entre deux feuilles de cellophane (Picard et Goullet, 1985). Les profils obtenus sont dessinés sur papier millimétré.

Résultats

Caractéristiques morphologiques

Les isolats de *Botryosphaeria* provenant de feuilles de cocotier présentent une morphologie comparable en ce qui concerne les dimensions des spores, 18-20 µm x 8-10 µm, ainsi qu'un mycélium généralement blanc sans production de pycnides ou présentant peu de stromas (photo 2). Les isolats provenant d'autres plantes ou de noix de cocotier, et qui s'avèrent non pathogènes sur cocotier, forment un autre groupe : dimensions des spores plus importantes 28 µm x 14 µm, mycélium noir, production rapide et abondante de stromas (tableau 3).

Par ailleurs, deux isolats provenant de *Bactris* sp. et de *Roystonea* présentent des spores de petite taille, 16 µm x 8 µm et s'avèrent également non pathogènes sur cocotier.

Pouvoir pathogène sur cocotier

La plupart des isolats de *Botryosphaeria* prélevés sur feuilles de cocotier sont pathogènes sur cocotier (tableau 3). S'y ajoute, l'isolat AR 026 provenant du fruit de la passion et qui produit un mycélium caractéristique semblable à celui des isolats prélevés sur cocotier. Le pouvoir pathogène varie selon l'isolat, allant de petites lésions de 15 mm x 10 mm jusqu'à 45 mm x 10 mm le 21^e jour après inoculation artificielle (photo 3). La plupart des isolats pathogènes produisent des stromas sur les lésions, à l'exception des isolats AR 018, 019 et 052 (tableau 3).

Analyses isoenzymatiques

Les profils électrophorétiques des dix enzymes pour chacun des 54 isolats étudiés se sont montrés reproductibles. Une différenciation est obtenue avec les α estérases (α EST) et les β glucosidases (β GLUS), mais aussi avec les malates déshydrogé-

Tableau 3. Symptômes produits par l'inoculation de 54 souches de *Botryosphaeria* spp. sur feuille de cocotier PB 121 (NJM x GOA) en serre, octobre-novembre 1992
Symptoms produced by inoculation of 54 Botryosphaeria spp. strains on PB 121 (MYD x WAT) coconut leaves in the greenhouse, October-November 1992

Souches/Strains	Taille moyenne des lésions/Mean lesion size			Pouvoir pathogène/Pathogenicity scale	stroma/stromas
	7 jours/7 days	14 jours/14 days	21 jours/21 days		
AR 01	-	-	-	0	*(-)
AR 02	-	-	-	0	-
AR 03	-	-	-	0	-
AR 04	10 x 0.5	15 x 10	20 x 10	1	**(+)
AR 05	10 x 5	20 x 10	15 x 10	1	-
AR 06	10 x 10	30 x 10	40 x 10	3	-
AR 07	-	-	-	-	-
AR 08	-	-	-	-	-
AR 09	-	-	-	-	-
AR 10	-	-	-	-	-
AR 11	-	-	-	-	-
AR 12	-	-	-	-	-
AR 13	-	-	-	-	-
AR 14	-	-	-	-	-
AR 15	-	-	-	-	-
AR 16	-	-	-	-	-
AR 17	15 x 10	20 x 10	20 x 10	1	+
AR 18	10 x 10	15 x 10	25 x 10	2	-
AR 19	10 x 10	25 x 10	40 x 10	3	-
AR 20	15 x 10	20 x 10	25 x 10	2	+
AR 21	-	-	-	-	-
AR 22	10 x 10	15 x 10	30 x 10	2	+
AR 23	-	-	-	-	-
AR 24	-	-	-	-	-
AR 25	-	-	-	-	-
AR 26	10 x 10	25 x 15	35 x 15	3	+
AR 27	-	-	-	-	-
AR 28	-	-	-	-	-
AR 29	-	-	-	-	-
AR 30	-	-	-	-	-
AR 31	-	-	-	-	-
AR 32	10 x 5	30 x 10	35 x 15	3	+
AR 33	15 x 10	25 x 15	40 x 20	3	+
AR 34	-	-	-	-	-
AR 35	-	-	-	-	-
AR 36	10 x 10	10 x 10	15 x 10	1	+
AR 37	15 x 10	17 x 10	20 x 10	1	+
AR 38	10 x 5	20 x 10	30 x 15	2	+
AR 39	20 x 10	25 x 10	32 x 10	3	+
AR 40	15 x 10	17 x 10	20 x 10	1	+
AR 41	13 x 10	18 x 10	23 x 10	2	+
AR 42	15 x 12	25 x 15	45 x 15	3	+
AR 43	10 x 10	15 x 12	20 x 15	1	+
AR 44	14 x 10	20 x 12	25 x 15	2	+
AR 45	10 x 5	25 x 12	30 x 15	2	+
AR 46	-	-	-	-	+
AR 47	-	-	-	-	+
AR 48	10 x 10	25 x 15	35 x 20	3	+
AR 49	15 x 10	25 x 10	30 x 10	2	+
AR 50	10 x 10	15 x 10	25 x 10	2	+
AR 51	13 x 10	20 x 12	25 x 15	2	+
AR 52	10 x 10	15 x 10	20 x 10	2	-
AR 53	-	-	-	-	-
AR 54	10 x 10	20 x 10	25 x 10	2	+

Pouvoir pathogène évalué selon une échelle de 0 à 3/Pathogenicity assessed on a scale of 0-3:

0 : pas de symptôme/no symptoms

1 : petite lésion (<21 mm de longueur)/small lesion (<21 mm of length)

2 : lésion de taille moyenne (de 22 mm à 30 mm)/moderate size lesion (from 22 mm to 30 mm)

3 : lésion importante (>31 mm de longueur)/extensive lesion (>31 mm of length)

*(-) : réaction négative/negative reaction

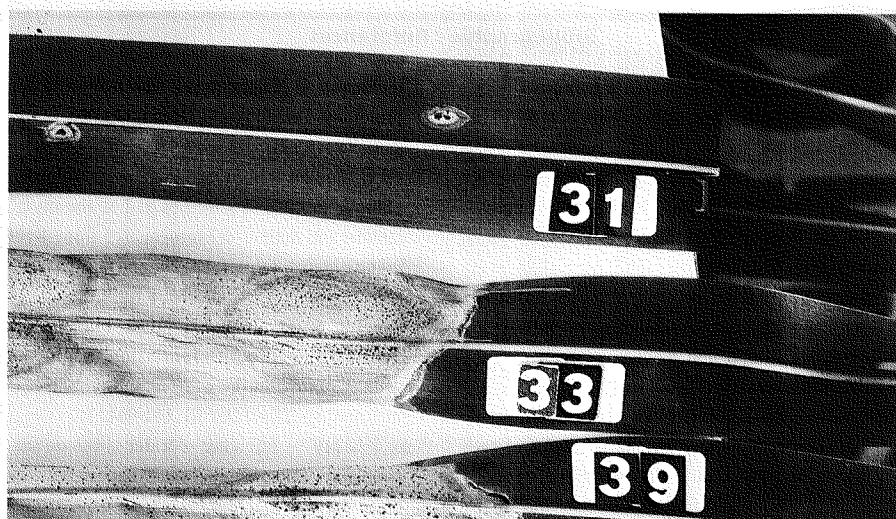


Photo 3 : Comparaison entre un isolat non pathogène (AR 31) et deux isolats pathogènes AR 33 et AR 39 (noter la présence de stromas avec les isolats pathogènes)
Comparison between a non-pathogenic isolate (AR 31) and two pathogenic isolates AR 33 and AR 39 (note the stromas with the pathogenic isolates)

Photo G. Blaha

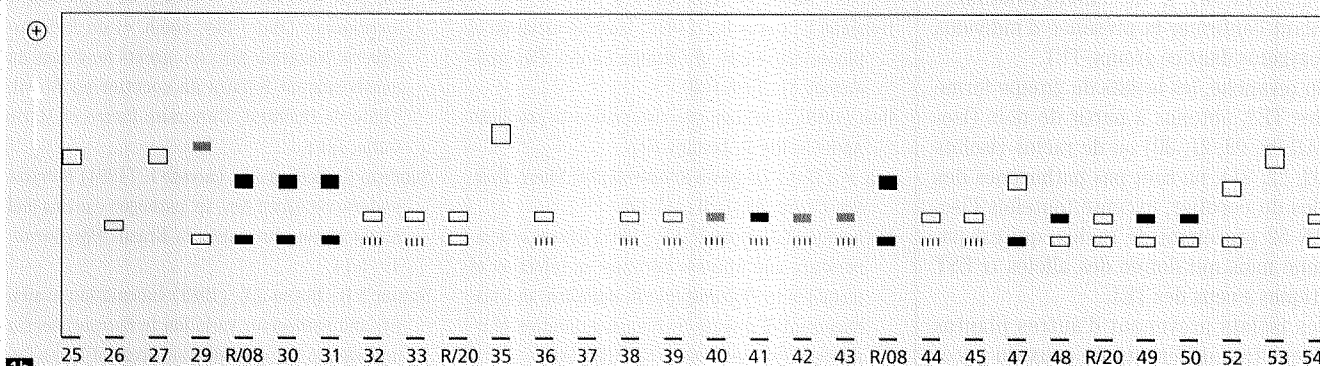
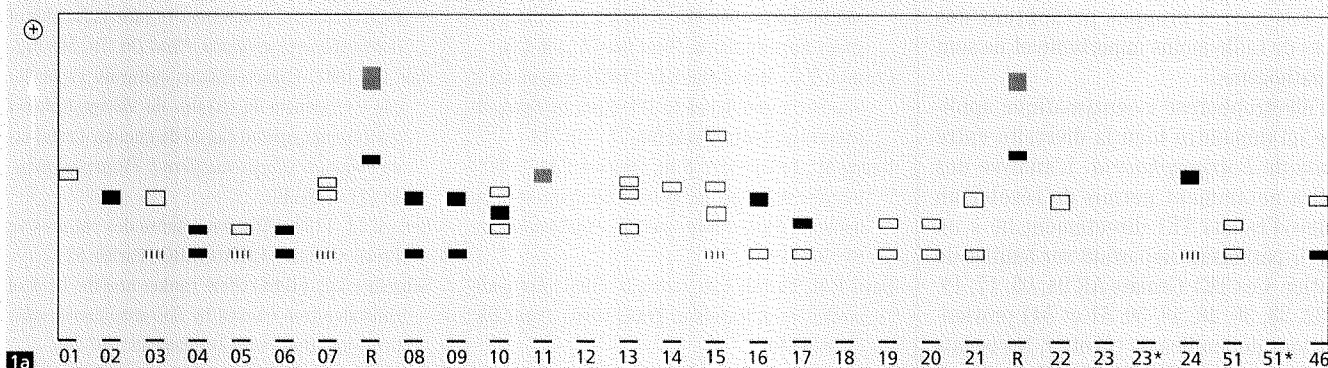


Figure 1a et 1b. Variation électrophorétique de l'enzyme malate-déshydrogénase (MDH) pour les isolats de *Botryosphaeria*. Chaque bande représente un isolat différent

Electrophoretic variation of enzyme malate-dehydrogenase (MDH) of *Botryosphaeria* isolates. Each lane represents a separate isolate

R/ : isolat de référence / reference isolate

* : échantillon traité au mercaptoéthanol / sample treated with mercaptoethanol

nases (MDH) qui présentent plusieurs types électrophorétiques (figures 1 a et 1 b) dont deux très caractéristiques, TE1, avec deux bandes rapprochées et TE2, avec deux bandes espacées.

TE1 = les isolats AR 04, 05, 06, 17, 19, 20, 32, 33, 36, 48, 49, 50, 51, 54 apparentés aux isolats monoascospores 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 et 45 à une seule bande se situant au niveau supérieur de TE1.

TE2 = les isolats AR 03, 08, 09, 16, 21, 30, 31, 46, 47, 52, ainsi que les isolats AR 02 et 22 à une seule bande commune se situant au niveau de la bande supérieure de TE2.

Pour tous les autres isolats, les MDH présentent un polymorphisme important :

- AR 015 (*Uricuri*) avec cinq bandes ;
- AR 013 (*Bactris*) et AR 10 (noix de coco-tier) avec trois bandes ;

- AR 26, avec une bande intercalaire à celles de TE1 ;
- AR 35, avec une bande plus haute que toutes les autres ;
- AR 24 et 29 avec un profil à deux bandes plus espacées que TE2.

Certains isolats ne produisent aucune bande : AR 12, 18, 23 et 37, mais les isolats 18 et 37 par leur profil α EST peuvent être classés dans TE1.

Discussion

Les caractéristiques morphologiques et culturales des isolats *Botryosphaeria* étudiés sont variables ; toutefois, les isolats donnant un mycélium blanc sont généralement pathogènes et ceux donnant un mycélium noir sont moins pathogènes. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une corrélation entre l'aptitude des isolats à produire des stromas et leur pouvoir pathogène sur cocotier.

Mais si les isolats sont classés selon les dimensions des spores, les isolats pathogènes des feuilles du cocotier se trouvent dans le même groupe, avec des spores de 18-20 µm x 8-10 µm, tandis que l'autre groupe, non pathogène, présente des spores de taille plus importante, 24-28 µm x 8-10 µm. Les autres groupes présentent des spores de taille moins importante et ne sont pas pathogènes.

L'électrophorèse isoenzymatique appliquée ici démontre bien la diversité entre isolats de *Botryosphaeria*. L'analyse des MDH a notamment permis de révéler un groupe d'isolats TE1 directement lié à un pouvoir pathogène important sur feuilles de cocotier. Ces TE1 (isolats AR 04, 05, 17, 19, 20, 32, 33, 36, 48, 49, 50, 51 et 54) proviennent tous de feuilles de cocotier, les isolats monoascospores (AR 38 à AR 45) ou de périthèces (AR 33), à une bande commune, semblant confirmer la présence d'individus homozygotes dans ce groupe TE1.

En revanche, les isolats du groupe formé par les TE2, obtenus à partir de noix (isolats AR 08, 09, 21, 30) ou de rachis (isolats AR 02, 22, 31), ne sont pas pathogènes des folioles du cocotier, excepté toutefois l'isolat AR 52 provenant de rachis, qui est pathogène mais qui donne des allèles α EST identiques à ceux des TE1.

Les isolats provenant d'autres plantes s'avèrent très différents de ceux du cocotier, par une absence des caractères présentés par les TE1 ou les TE2, excepté l'isolat AR 26, provenant du fruit de la passion, qui s'avère pathogène sur cocotier et qui présente un profil MDH différent de celui de tous les autres isolats. Cependant, il faut noter que cet isolat AR 26 donne, comme l'isolat AR 52, des allèles communs α EST identiques à ceux de TE1.

Cette analyse conforte l'hypothèse d'une différence génétique entre isolats pathogènes du cocotier. L'appellation *Botryosphaeria cocogena* proposée par Subileau (1993) (Subileau *et al.*, 1994) est globalement justifiée ; on notera toutefois une certaine spécialisation parasitaire, en fonction des tissus atteints.

Bibliographie / References

- Batista A.C. (1948) *Catacauma torrendiela* n. sp. Agente da verrugose do coqueiro. *Bol. SAIC* 15 (2) : 129-133.
- Blaha G. (1990) Profils isoenzymatiques et RFLP pour l'identification des *Phytophthora* du cacaoyer. *Bull. OEPP* 20 : 59-65.
- Bosland P.W., Williams P.H. (1987) An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. *Can. J. Bot.* 65 : 2067-2073.
- Burdon J.J., Marshall D.R. (1981) Isozyme variation between species and formae speciales of the genus *Puccinia*. *Can. J. Bot.* 59 : 2628-2634.
- Cline W.O., Milholland R.D. (1992) Root dip treatments for controlling blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea* in container-grown nursery plants. *Plant Dis.* 76 : 136-138.
- Creswell T.C., Milholland R.D. (1987) Responses of blueberry genotypes to infection by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.* 71 : 710-713.
- Damaj M., Jabaji-Hare S.H., Charest P.M. (1993) Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology* 83 : 864-871.
- Davis R.M., Farrald C.J., Davila D. (1987) *Botryodiplodia* trunk lesions in Texas citrus. *Plant Dis.* 71 : 848-849.
- Franco E. (1975) O fogo do coqueiro. *O Estado de Sao Paulo*, Supl. Agrícola (1040) : 16.
- Helmann R., Christ B.J. (1991) Isozyme variation of physiologic races of *Ustilago hordei*. *Phytopathology* 81 : 1536-1540.
- Iboe (1989) Levantamento sistemático da produção Agrícola. Rio de Janeiro, 59 p.
- Joly P. (1916) Le genre *Sphaerodothis* Sherr. *Bull. Res. Coun. Isr.* 10 B : 187-193.
- Michailides T.J., Morgan D.P. (1992) Effects of temperature and wetness duration on infection of pistachio by *Botryosphaeria dothidea* and management of disease by reducing duration of irrigation. *Phytopathology* 82 : 1399-1406.
- Milholland R.D. (1972) Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stems. *Phytopathology* 62 : 654-660.
- Nygaard S.L., Elliot C.K., Cannon S.J., Maxwell D.P. (1989) Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* 79 : 773-780.
- Oudemans P., Coffey M.D. (1991) Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycol. Res.* 95 : 19-30.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., Quero J.Y. (1987) Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Technique et Documentation Lavoisier (Paris), 227 p.
- Picard B., Goullet P.H. (1985) Comparative electrophoretic profiles of esterases and of glutamate, lactate and malate dehydrogenases from *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* and *A. sobria*. *J. Gen. Microbiol.* 131 : 3385-3391.
- Powers H.R., Lin D., Hubbes M. (1989) Interspecific and intraspecific differentiation within the genus *Cronartium* by isozyme and protein pattern analysis. *Plant Dis.* 73 : 691-694.
- Pusey P.L. (1989) Influence of water stress on susceptibility of nonwounded peach bark to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.* 73 : 1000-1003.
- Pusey P.C., Reilly C.C., Okie W.R. (1986) Symptomatic responses of peach trees to various isolates of *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.* 70 : 568-572.
- Ram C. (1993) Características culturais, esporulação e virulência do «strain» do *Botryodiplodia theobromae*, agente causal da queima das folhas do coqueiro (*Cocos nucifera*). *Fitopatol. Bras.* 18 (2) : 143-146.
- Renard J.L. (1990) Mission défense des cultures au Brésil. Cocotier. CIRAD/IRHO (Paris), 52 p.
- Schreiber L.R. (1964) Stem canker and die back of rhododendron caused by *Botryosphaeria ribis* Gross and Dug. *Plant Dis. Rep.* 48 : 207-210.
- Subileau C. (1993) Systématique et biologie du complexe parasitaire constitué du *Phyllachora torrendiela* (Bat.) nov. comb. et du *Botryosphaeria cocogena* nov. sp., agents fongiques du dessèchement foliaire du cocotier au Brésil. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 121 p.
- Subileau C., Renard J.L., Lacoste L. (1994) *Botryosphaeria cocogena* nov. sp. pathogen causing leaf blight of coconut palms in Brazil. *Mycotaxon.* 41 : 5-14.
- Sutton T.B., Boyne J.V. (1983) Inoculation availability and pathogenic variation in *Botryosphaeria dothidea* in apple production areas of North Carolina. *Plant Dis.* 67 : 503-506.
- Warwick D.R.N. (1989) Principais doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no Brasil. EMBRAPA/CNPq (Aracaju), 26 p.
- Warwick D.R.N., Bezerra A.P.O., Renard J.L. (1991) Reaction of coconut hybrids to leaf blight (*Botryodiplodia theobromae* Pat.). Field observations. *Oléagineux* 46 (3) : 100-108.
- Wong A.L., Willets H.J. (1975) Electrophoretic studies of Australian, North American and European isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *J. Gen. Microbiol.* 90 : 355-359.



«Queima das folhas» on coconut

Warwick D.¹, Renard J.L.², Blaha G.²

¹ EMBRAPA, CP 44, Aracaju, SE 49001.970, Brazil

² CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Coconut (*Cocos nucifera* L.) is an ecologically correct smallholder crop and offers a wide range of dietary income and employment opportunities. It was first introduced into Brazil by the Portuguese in 1553 and today is widely grown along the coastal areas of the Northwestern region, which provides 72% of national production. There are approximately 180,000 ha of coconut palms, but the average yield is only 20 nuts/palm/year (Iboe, 1989). This low productivity is a consequence of low-yielding varieties, irregular rainfall distribution and attacks by a number of insect pests and fungal diseases.

Leaf blight (queima das folhas) responsible for severe losses in different coconut growing areas, is the main coconut disease in Brazil (Warwick, 1989). Symptoms include rapid wilting, browning or reddening of leaves and, eventually, a reduction in the assimilating leaf area, along with premature breakage of leaf stalks at their point of insertion on the stem; this causes the bunches, which are usually supported by the leaf, to sink, leading to immature nut fall (Warwick, Bezerra and Renard, 1991). The disease was first reported in the State of Sergipe (Franco, 1975) and has spread rapidly. Field surveys have revealed its existence in the States of Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Pará (Renard, 1990). More recently, it was detected in French Guiana (Renard, personal communication), which indicates that the fungi are moving towards the Northwest of South America, to other coconut producing countries.

In the past time, the «queima das folhas» was attributed to a complex of three fungi: a conidial form, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maudl associated with two ascomycete fungi, *Phyllachora torrendiella* (Batista, 1948) and *Sphaerodothis acrocomiae* (Joly, 1916). A new denomination was recently proposed for the perfect stage of the causal agent of leaf blight, *Botryosphaeria cocogena* Subileau (Subileau, 1993; Subileau *et al.*, 1994). *Botryosphaeria* sp. is often found on other perennial crops (Clime and Milholland, 1972; Milholland, 1972; Schreiber, 1964). Blueberry stem blight caused by *B. dothidea* is the main cause of crop failure in one and two-year old plantings in North Carolina (Creswell and Milholland, 1987). In peach, water stress increases the severity of the disease (Pusey, 1989). Pistachio shoot blight caused by *Botryosphaeria panicle*, is a common disease in orchards in Northwestern California

(Michailides and Morgan, 1992). The variation in pathogenicity of *B. dothidea* isolates has been reported by other workers: Davis *et al.* (1987) discovered substantial variability in the virulence of different isolates causing trunk disease in young citrus trees; Creswell and Milholland (1987) classified isolates from blueberry into two virulence groups; variation in pathogenicity has also been reported on other host plants (Pusey *et al.*, 1986; Sutton and Boyne, 1983).

Ram (1993) reported that the isolates of *Botryosphaeria* from other plants were not pathogenic to coconut, but could not find any differences in conidia size.

The purpose of this work was to assess the variability of morphological and culture characteristics, and the pathogenicity on coconut, of *Botryosphaeria* isolates from various organs of the coconut palm (nuts, leaves, rachis) or from other host plants. Variability in the isozyme banding patterns was also sought, given its successful use in isozyme analyses to characterize and identify isolates belonging to the same species (Oudemans and Coffey, 1991; Nygaard *et al.*, 1989), or to species of a given genus (Powers *et al.*, 1989; Dosland and Williams, 1987; Wong and Willets, 1975). Intraspecific differences have also been revealed with this technique, formae speciales have been identified (Burdon and Marshall, 1991), and differences between physiological races have been studied (Helmann and Christ, 1991; Damaj *et al.*, 1993).

Material and methods

Fifty-four isolates from different host plants and locations were studied (table 1). The isolates were obtained either from cultures in collections or from samples taken off infected coconut tissues in different regions of Brazil and French Guiana.

Morphological characteristics

The isolates were cultured on oat medium for seven days at 24°C. Radial growth, the colour of the mycelium and spore production were noted. The diameters of the conidia were measured on 20 spores per isolate.

Pathogenicity on coconut

The pathogenicity and virulence of each isolate were investigated in the greenhouse on young PB 121 coconut hybrids, Malayan Yellow Dwarf x West African Tall (photo 1). The inoculum consisted of 5 mm diameter plugs taken from

7 day old cultures on a water-agar medium. Ten mycelium plugs from each isolate were placed on wounds made on the underside of the coconut leaflets using a sterilized scalpel; the control palms received plugs of sterile water. The leaves were wrapped in plastic bags to prevent desiccation. The trial comprised three replicates. Symptoms after inoculations were examined each week and measured. The leaves were also examined for stroma formation on the lesions.

Isozyme analysis by gel electrophoresis

The isolates were cultured on V8 agar medium (200 ml of V8 juice, 2.5 g of CaCO₃, 15 g of agar and 800 ml of distilled water), with a cellophane disc overlay and incubated in the dark at 23°C for seven days. The mycelium was collected with a spatula and ground by ultrasound at 4°C for 30 seconds in a 0.1 M citrate buffer, pH 7.0 (1 g/ml). The samples were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. The supernatants were stored at -18°C in Eppendorf cryotubes until used.

Horizontal starch gel electrophoresis (12% W/V) was used according to the method described by Blaha (1990); the buffers and stains were those used by Pasteur *et al.* (1987). Fifteen microlitres of each sample was deposited on Whatman No.3 filter paper (5x10 mm), which was inserted in a slot cut into the gel. Migration occurred at 150 V/25 mA/gel in an HE 99 horizontal tank (Hoefer Scientific Instruments, USA) kept at 4°C. The migrating front was displayed by bromophenol blue. The buffers used for migration were Tris citrate, pH 8.0 (TC8), Histidine, pH 6.0 (H6) and Lithium Borate, pH 8.3 (LiOH). The enzyme systems sought are given in table 2.

After migration, each gel was cut into four 2 mm thick slices, so that four different enzymatic systems could be detected for each sample. The slices were stained for each of the ten enzymes according to selective protocols (Pasteur *et al.*, 1987) then fixed in 7% acetic acid and dried between two sheets of cellophane (Picard and Goulet, 1985). The patterns obtained were presented as full-scale line drawings on grid paper.

Results

Morphological characteristics

Botryosphaeria isolates from coconut leaves were morphologically similar in spore size, 18-20 µm x 8-10 µm, and usually had a white

mycelium with no pycnidium production, or had few stromas (photo 2). Isolates from other plants, or from coconut fruits, which were not pathogenic to coconut plants, formed a different group: larger spore size, 28 μm x 14 μm , black mycelium, rapid and abundant stroma production (table 3).

There were also two isolates from *Bactris* sp. and *Roystonea* which had small size spores, 16 μm x 8 μm and also proved to be non-pathogenic to coconut.

Pathogenicity to coconut

Most of the *Botryosphaeria* isolates taken from coconut leaves were pathogenic to coconut (table 3), as was isolate AR 026 from passion fruit, which produced a typical mycelium similar to that of isolates taken from coconut. Pathogenicity varied depending on the isolate, ranging from small lesions, 15 mm x 10 mm to 45 mm x 10 mm 21 days after artificial inoculation (photo 3). Most of the pathogenic isolates produced stromas on the lesions, apart from isolates AR 018, 019 and 052 (table 3).

Isozyme analysis

The banding patterns of the ten enzymes for each of the 54 isolates examined proved to be reproducible. Differentiation was obtained with α esterases (α EST) and β glucosidases (β GLUS), but also with malate dehydrogenases (MDH) which gave several electrophoretic types (fig. 1 A and 1 B), two of which were very characteristic, ET1 with two close bands, and ET2 with two widely separated bands.

ET1 = isolates AR 04, 05, 06, 17, 19, 20, 32, 33, 36, 48, 49, 50, 51, 54 related to the monoascospore isolates 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 et 45 with only one band in the upper level of ET1.

ET2 = isolates AR 03, 08, 09, 16, 21, 30, 31, 46, 47, 52, along with isolates AR 02 and 22 with a single common band on the level of the upper band of ET2.

For all the other isolates, the MDH exhibited substantial polymorphism:

- AR 015 (*Uricuri*) with five bands;
- AR 013 (*Bactris*) and AR 10 (coconut fruit) with three bands;
- AR 26, with a band between those of ET1;
- AR 35, with one band higher than all the others;
- AR 24 and 29 with a pattern of two bands more widely spaced than ET2;

Some isolates did not produce any band: AR 12, 18, 23 and 37, but isolates 18 and 37, given their α EST pattern, can be classed in ET1.

Discussion

The morphological and culture characteristics of the *Botryosphaeria* isolates studied were variable; however, the isolates giving a white mycelium were generally pathogenic and those giving a black mycelium were less pathogenic. No correlation could be found between the ability of isolates to produce stromas and their pathogenicity on coconut.

However, if isolates were classed according to spore size, the pathogenic isolates from coconut leaves fell into the same group, with spore sizes of 18-20 μm x 8-10 μm , whereas the other, non-pathogenic, group had larger spores, 24-28 μm x 8-10 μm . The other groups had spores sizes narrower and were not pathogenic.

The isozyme electrophoresis used here clearly showed the diversity between *Botryosphaeria* isolates. Analysis of the MDH in particular revealed a group of isolates, ET1, directly linked to substantial pathogenicity on coconut. These ET1 (isolates AR 04, 05, 17, 19, 20, 32, 33, 36, 48,

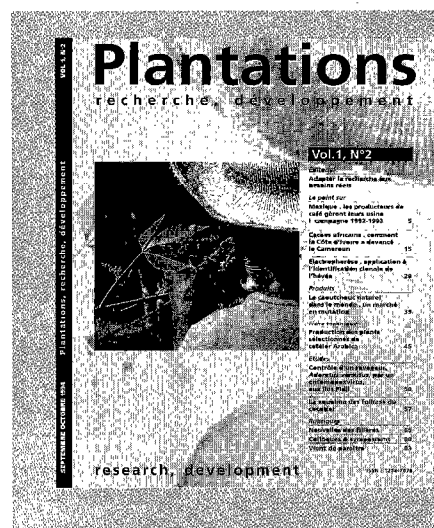
49, 50, 51 and 54) all came from coconut leaves, with the monoascospore isolates (AR 38 to AR 45) or of perithecia (AR 33), with a common band, seeming to confirm, moreover, the existence of homozygous individuals in this ET1 group.

On the other hand, the isolates in the group formed by the ET2 obtained from coconut fruits (isolates AR 08, 09, 21, 30) or rachises (isolates AR 02, 22, 31) were not pathogenic on coconut leaflets, apart from AR 52 however, from a rachis, which was pathogenic but which gave α EST alleles identical to those of the ET1.

The isolates from other plants proved to be very different from those obtained on coconut, through an absence of characters found in the ET1 and ET2, apart from isolate AR 26, from passion fruit, which was pathogenic on coconut and had a different MDH banding pattern from that of all the other isolates. However, it should be noted that this isolate AR 26, like isolate AR 52, gave common α EST alleles identical to those of ET1.

This analysis backs the hypothesis of a genetic difference between isolates pathogenic to coconut. The denomination *Botryosphaeria cocogena* proposed by Subileau (1993) (Subileau *et al.*, 1994) is generally justified; however a certain parasite specialization is seen depending on the coconut tissues affected.

Acknowledgements. — This research was partly supported by a scholarship from the French Embassy in Brazil and the EM-BRAPA-CIRAD agreement.



Plantations, recherche, développement au carrefour des cultures pérennes de la zone tropicale humide

Plantations, Recherche, Développement, at the crossroads between tree crops in the humid tropical zone

Plantations, recherche, développement, en la encrucijada de los cultivos perennes de la zona tropical húmeda